

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR ORALEN IMMUNISIERUNG
MIT TETANUS-TOXOID**

Heide Starflinger

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551924_0076

Aus dem Institut für Mikrobiologie und
Infektionskrankheiten der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR ORALEN IMMUNISIERUNG MIT TETANUS-TOXOID

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von
Heide Starflinger
aus
Bad Peterstal

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. R. Fritsch



Tag der Promotion: 26. Juli 1974

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>SCHRIFTTUM ÜBER DIE LOKALE IMMUNISIERUNG GEGEN BAKTERIENTOXINE</u>	2
2.1 <u>Orale Immunisierung gegen Bakterientoxine</u>	2
2.11 Orale Applikation von Tetanus-Toxin und Tetanus-Toxoid	2
2.12 Orale Applikation von Diphtherie-Toxin und Diphtherie-Toxoid	4
2.13 Orale Applikation von Botulinum-Toxoid	6
2.2 <u>Rektale Immunisierung gegen Bakterientoxine</u>	7
2.21 Rektale Applikation von Tetanus-Toxin und Tetanus-Toxoid	7
2.22 Rektale Applikation von Diphtherie-Toxin und Diphtherie-Toxoid	7
2.3 <u>Nasale Immunisierung gegen Bakterientoxine</u>	8
2.31 Nasale Applikation von Tetanus-Toxoid	8
2.32 Nasale Applikation von Diphtherie-Toxin und Diphtherie-Toxoid	9
2.4 <u>Immunisierung gegen Bakterientoxine mittels Aerosol</u>	10
2.41 Applikation von Tetanus-Toxin und Tetanus- Toxoid in Form von Aerosol	10
2.42 Applikation von Diphtherie-Toxin und Diphtherie-Toxoid in Form von Aerosol	10

	Seite
2.5 <u>Konjunktivale Immunisierung gegen Bakterientoxine</u>	11
2.51 Konjunktivale Applikation von Tetanus-Toxin und Tetanus-Toxoid	11
2.52 Konjunktivale Applikation von Diphtherie-Toxin und Diphtherie-Toxoid	12
3. <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	20
3.1 <u>Material und Methoden</u>	20
3.11 Versuchstiere	20
3.12 Impfstoff	20
3.13 Immunisierung	20
3.14 Belastungsversuche	22
3.15 Auswertung der Belastungsversuche	23
3.16 Serumgewinnung	24
3.17 Antitoxinbestimmung	24
3.2 <u>Ergebnisse</u>	25
3.21 Ergebnis der Belastungsversuche nach einmaliger Applikation des Tetanus-Toxoids	25
3.22 Ergebnis der Belastungsversuche nach mehrmaliger Applikation des Tetanus-Toxoids	26
3.23 Ergebnis der Belastungsversuche nach einmaliger Applikation des Tetanus-Toxoids bei verschiedenen Funktionszuständen des Magen-Darm-Kanals	27
3.24 Ergebnis der Belastungsversuche nach einmaliger Applikation des Tetanus-Toxoids mit verschiedenen Impfstoffdosen und Impfstoffvolumina	28
3.25 Ergebnis der Belastungsversuche nach einmaliger Applikation des Tetanus-Toxoids bei verschiedenen Applikationsarten	29

	Seite
3.26 Ergebnis der Verträglichkeitsprüfung des oral applizierten Tetanus-Toxoids	30
3.27 Ergebnis der Antitoxinbestimmungen nach einmaliger Toxoidapplikation	31
3.28 Ergebnis der Antitoxinbestimmungen nach mehrmaliger Toxoidapplikation	32
4. <u>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</u>	39
5. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	47
6. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	50

1. E I N L E I T U N G

Die orale Immunisierung gewinnt immer größere Bedeutung in der Human- und Tiermedizin. Seit bewiesen wurde, daß eine orale Immunisierung mit vermehrungsfähigen viralen und bakteriellen Antigenen möglich ist, versucht man auch, Schutzimpfungen mit nicht vermehrungsfähigen Antigenen oral durchzuführen.

Die Notwendigkeit einer Impfung gegen den fast immer tödlich verlaufenden Tetanus steht außer Zweifel. Zur Zeit sterben jährlich auf der ganzen Welt noch etwa eine halbe Million Menschen an dieser Infektion. Eine orale Immunisierung gegen das Toxin von *Clostridium tetani* wurde bisher mit wechselndem Erfolg erprobt und wegen der guten Wirksamkeit der parenteralen Impfung letztlich immer abgelehnt. Auf Grund der Vorteile einer oralen Immunisierung schien es gerechtfertigt, nochmals die Wirksamkeit einer Schluckimpfung gegen Tetanus, vergleichend mit der einer parenteralen Impfung zu überprüfen. Gleichzeitig sollte die Frage beantwortet werden, ob es grundsätzlich möglich ist, gegen Clostridien-Toxine oral zu immunisieren.

2. S C H R I F T T U M

ÜBER DIE LOKALE IMMUNISIERUNG GEGEN BAKTERIENTOXINE

2.1 Orale Immunisierung gegen Bakterientoxine

Eine Literaturübersicht über die orale Immunisierung gegen Bakterientoxine muß neben den Untersuchungen über eine orale Impfung mit Toxoid auch die Arbeiten über eine orale Verabreichung von Toxinen miteinbeziehen. Diese Versuche gingen meist Hand in Hand und ergänzten sich speziell was die Frage der Resorption des Toxoids bzw. des Toxins anbetrifft. Auch bei der Beurteilung der Ergebnisse wurde in den meisten Arbeiten kein Unterschied zwischen Toxin und Toxoid gemacht, da man davon ausging, daß sich beide im Magen-Darm-Kanal gleich verhalten.

2.11 Orale Applikation von Tetanus-Toxin und Tetanus-Toxoid

Bevor Untersuchungen mit dem Ziel einer oralen Immunisierung gegen das Tetanus-Toxin angestellt wurden, befaßten sich die Wissenschaftler mit dem Problem einer Resorption dieses Toxins im Magen-Darm-Kanal. Dabei standen sich von Anfang an zwei unterschiedliche Auffassungen gegenüber. Der größte Teil der Untersucher (11,13,15,36,38,41,52,53, 65,66,68,69,70) kam zu dem Ergebnis, daß eine Resorption des Toxins vom intakten Magen-Darm-Kanal her nicht statt-

findet und die orale Toxinapplikation bei Versuchstieren weder Krankheitssymptome noch die Ausbildung einer Immunität zur Folge hat. Als Ursache für die fehlende Resorption des Toxins sah man die toxinzerstörende Wirkung von Ptyalin (11,70), Magensaft (13,41,68), Galle (41,65,70), Pankreassaft (11,41,69,70) und Darmsaft (69) an.

Daneben wurde eine Abschwächung des Tetanus-Toxins durch die Bindung an Nahrungsteile diskutiert (53). Auch eine Magen-Darm-Passage ohne eine Veränderung und Adsorption des Toxins wurde beobachtet (52).

RAMON und GRASSET (47) kamen zu dem gegenteiligen Befund. Sie erzielten durch mehrfache hohe Gaben Tetanus-Toxin eine schwache Immunität bei Meerschweinchen, ohne daß die Tiere dabei an Tetanus erkrankten. Auch DUMAS (17) beobachtete eine Resorption des Toxins nach oraler Verabreichung an Versuchstiere. Während bei sehr jungen Versuchstieren schon nach alleiniger Toxingabe Tetanussymptome auftraten (48), konnte bei erwachsenen Tieren nur nach Gallevorbehandlung eine ausreichende Resorption beobachtet werden (47).

Auf Grund ihrer guten Resorptionsergebnisse nach oraler Toxinapplikation versuchten RAMON und GRASSET 1926 als erste eine orale Immunisierung mit Tetanus-Anatoxin (47). Der Versuch gelang bei sehr jungen Tieren sofort (40,48), bei erwachsenen Kaninchen jedoch nur nach Galleprämedikation und massiver Antigendosierung (47). Durch wieder-

holte orale Toxoidzufuhr sowohl in Form einer Erinnerungsimpfung als auch als Primärimpfung wurde bei Meer-schweinchen die Bildung von Serumantitoxinen stimuliert (39). Der Impfschutz war um das 5- bis 50-fache schwächer als nach einer subkutanen Verabreichung der gleichen Dosis Anatoxin.

Diese Ergebnisse konnten von LEMETAYER (35) nicht nachvollzogen werden.

Auch beim Menschen waren die Ergebnisse nicht einheitlich. Durch die orale Anatoxinapplikation konnten RAMON und ZOELLER (49) weder grundimmunisieren noch boostern. GREENBERG (27) beobachtete nach extrem hohen Dosen nur sehr schwache Immunreaktionen. VERONESI (64) gelang es dagegen in jüngster Zeit bei bereits subkutan vorimmunisierten Menschen und auch durch orale Primärimmunisierung eine befriedigende Immunantwort auszulösen.

Einen zusammenfassenden Überblick über diese Untersuchungen vermitteln Tabelle 1 und 2.

2.12 Orale Applikation von Diphtherie-Toxin und Diphtherie-Toxoid

Die Untersuchungen über eine orale Applikation des Diphtherie-Toxins liefen mit den Tetanus-Untersuchungen parallel und entsprachen diesen auch weitgehend in den Ergebnissen. In den meisten Versuchen wird die Möglich-

keit einer Resorption des Diphtherie-Toxins über den Magen-Darm-Trakt abgelehnt (13,36,38,41,52). Das Toxin wird durch Magensaft, Pepsin, Galle und Pankreassaft abgebaut oder inaktiviert.

Eine Resorption des Diphtherie-Toxins nach oraler Einverleibung beweisen DUMAS et al. (17) durch nachfolgende Intoxikationen bei Versuchstieren und BEHRING (4) sowie RAMON und GRASSET (47,48,49) durch den Nachweis einer schwachen Immunität.

Die Möglichkeit einer Primär- und einer Boosterimpfung durch orale Gabe von Diphtherie-Anatoxin wurde bei Versuchstieren sowohl befürwortet (26,39,47,48,49) als auch abgelehnt (16,28,77). Beim Menschen dagegen wurde einheitlich eine orale Primärimpfung mit Diphtherie-Toxoid als wenig oder gar nicht wirksam abgelehnt (27,34,37,39), ein oraler Sekundärstimulus hingegen von einer großen Zahl der Autoren als gefahrlose und schnelle Methode zur Revakzination empfohlen (7,14,27,37,42,43). Eine Ausnahme bilden nur die Untersuchungen von RAMON (47,48,49), der auch nach subkutaner Grundimmunisierung und Galleprämedikation mit oralen Diphtherie-Toxoidgaben beim Menschen keinen Anstieg der Serumantitoxine verzeichnen konnte.

POCKELS (44) versuchte eine orale Immunisierung gegen Diphtherie durch mehrfache Gabe eines Toxin-Antitoxin-Gemisches bei Schickpositiven Kindern. Der Impferfolg war

gut und ließ sich durch Variierung des Impf- und Dosierungsschemas sowie durch Hinzufügen eines Adjuvans noch wesentlich verbessern (54). Seine Ergebnisse konnten aber nicht reproduziert werden (6,19,20,33).

Auch eine orale Verabreichung einer hitzeinaktivierten Bakterienemulsion führte zu einer Immunität gegen Diphtherie (9,45). Sowohl beim Meerschweinchen als auch beim Menschen kam es zu einem Antitoxinanstieg, der aber als Schutz gegen eine Diphtherieinfektion nicht ausreichte.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Versuche zur oralen Immunisierung gegen Diphtherie.

2.13 Orale Applikation von Botulinum-Toxoid

Die orale Gabe von Botulinum-Anatoxin führte bei Kaninchen und Meerschweinchen zur Bildung von Serumantitoxinen (31,71). Eine Steigerung der Antitoxintiter konnte entweder nach Sensibilisierung mit einer kleinen Menge oral verabfolgtem Anatoxin (71) oder nach subkutaner Grundimmunisierung beobachtet werden (31).

Eine ausreichende Resorption des oral gegebenen Anatoxins konnte WELIKANOW (73) nur nach vorheriger Sensibilisierung der Darmwand durch Eingabe eines Dysenterie-Impfstoffes feststellen. Auf diese Weise oral immunisierte Kaninchen hatten noch ein Jahr nach der Impfung nachweisbare Antitoxintiter im Serum.

Die Verfütterung von Anatoxin oder eine Verabreichung mit der Magensonde über einen längeren Zeitraum führte dagegen zu keiner Immunität (31,34,72).

Einen Überblick über diese Versuche gibt Tabelle 2.

2.2 Rektale Immunisierung gegen Bakterientoxine

2.21 Rektale Applikation von Tetanus-Toxin und Tetanus-Toxoid

Die rektale Applikation mehrfacher hoher Dosen Tetanus-Toxin führte bei Versuchstieren zu keinen Krankheitssymptomen (8,12,21,24,67) und hinterließ keine nachweisbare Immunität. Die Ursache wurde auf unterschiedliche Inaktivierungsmechanismen zurückgeführt. Es wurde eine Hemmung der Toxinaktivität durch die Mucosa des Rektums (24), eine Verminderung der Toxizität durch die Mikrobenflora (8) und eine Zerstörung des Toxins durch das stark antitoxische Dünndarmsekret (67) beschrieben.

Durch die mehrfache rektale Verabreichung kleiner Dosen Tetanus-Anatoxin erreichte LEMÉTAYER bei Kaninchen und Meerschweinchen eine Immunisierung (35). Die erzielte Immunität war jedoch viel schwächer als die nach einer subkutanen Injektion der gleichen Antigenmenge.

2.22 Rektale Applikation von Diphtherie-Toxin und Diphtherie-Toxoid

Trotz wiederholter, massiver rektaler Applikation von Diphtherie-Toxin zeigten Kaninchen und Meerschweinchen weder Krankheitssymptome noch eine Immunität gegen den Erreger (21,24,62). Beim Hund (21) und in den Untersuchungen von BRETON und PETIT (9) auch beim Meerschweinchen kam es dagegen nach rektaler Einführung von Diphtherie-Toxin zu letalen Intoxikationen.

Rektal einverleibtes Diphtherie-Anatoxin rief beim Kaninchen und Meerschweinchen keinen Infektionsschutz hervor. Nach vorheriger Gallegabe ließ sich jedoch eine Immunantwort auslösen (9,29).

Bei einer mehrfachen rektalen Verabfolgung hitzeinaktivierter Diphtherieerreger traten bei Meerschweinchen bereits am zweiten Tage nach der letzten Impfung spezifische Antitoxine im Serum auf (9).

2.3 Nasale Immunisierung gegen Bakterientoxine

2.31 Nasale Applikation von Tetanus-Toxoid

Eine Instillation von Tetanus-Anatoxin in die Nase führte beim Kaninchen und beim Menschen zu einer Immunität (50). Auch nach einer nasal gegebenen Mischung aus Tetanus- und Diphtherie-Anatoxin konnten im Serum der Impflinge spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Allergische Reaktionen traten dabei nicht auf. Bei bereits subkutan vorimmunisierten Personen wird von sehr guten Titeranstiegen

nach nasaler Applikation des Tetanus-Anatoxins berichtet (1,25,51,55). Die nasale Tetanus-Toxoidapplikation wird als hervorragendes Mittel zur Revakzinierung empfohlen (25). Eine einmalige nasale Tetanus-Toxoidanwendung war als Booster ebenso gut wirksam wie eine subkutane Verabreichung des Impfstoffes (1).

2.32 Nasale Applikation von Diphtherie-Toxin und Diphtherie-Toxoid

DZIERZGOWSKY (18) sowie RAMON und ZOELLER (50,51) führten am Tier und am Menschen eine wirksame Diphtherieprophylaxe durch Einbringen von Toxin bzw. Anatoxin in die Nasenhöhle der Impflinge durch. Diese Ergebnisse fanden durch eine Vielzahl von Autoren ihre Bestätigung (10). Nur IBRAHIM (30) erreichte durch die nasale Verabreichung von Diphtherie-Toxoid bei Meerschweinchen keinen Infektionsschutz, führte dies aber selbst auf die wahrscheinlich zu niedrig gewählte Dosierung zurück. In einer Reihe von Feldversuchen wurde bei einer Erstimmunisierung die Überlegenheit der subkutanen Impfmethode gegenüber der nasalen deutlich (10). Für die Revakzinierung dagegen erwies sich die nasale Antigenverabfolgung vielfach als ein schnelles, schmerzloses und sicher wirkendes Impfvorgang, das einen starken Anstieg der Antitoxine im Serum bzw. einen negativen Ausfall der Schick-Reaktion bei Mensch und Versuchstier bewirkte (10).

2.4 Immunisierung gegen Bakterientoxine mittels Aerosol

2.41 Applikation von Tetanus-Toxin und Tetanus-Toxoid in Form von Aerosol

Inhalationsversuche mit Tetanus-Toxin zeigten, daß bereits eine Inhalationsdauer von fünf Minuten genügt, um empfängliche Tiere zu vergiften (61). Bei Verfütterung wurde dagegen eine vielfache tödliche Dosis reaktionslos vertragen.

SILBERSCHMIDT (59,60) wies nach wiederholten Inhalationen von Tetanus-Toxoid einen wirksamen Schutz bei Versuchstieren gegen eine Tetanusinfektion nach. Die Immunität trat sehr rasch ein. Der Immunitätsgrad war dabei von der Anzahl der Inhalationen und der Menge des inhalierten Antigens abhängig. TITARENKO (63) und YAMASHIROYA et al. (75) bestätigen SILBERSCHMIDTs Befunde.

Eine Revakzinierung mit Aerosol nach einmaliger subkutaner Impfung wurde als eine der subkutanen ebenbürtige Methode bezeichnet, die zudem schmerzlos durchgeführt werden kann und bei der sich der Erfolg rasch einstellt (2,23,63,76). Einige Wissenschaftler (2,76) fanden nach der Revakzinierung durch Inhalation des Antigens sogar höhere Antikörpertiter im Serum als nach parenteraler Boosterung.

2.42 Applikation von Diphtherie-Toxin und Diphtherie-Toxoid in Form von Aerosol

Wiederholte Inhalationen von Diphtherie-Toxoid (59,60) riefen bei Versuchstieren eine wirksame Immunität hervor. Eine Aerosolbehandlung mit Diphtherie-Toxin (61) führte andererseits zu charakteristischen Krankheitssymptomen. Die Bildung von Serumantitoxinen sowie der Zeitpunkt des maximalen Antitoxintiters verzögerten sich nach Aerosolimpfung im Vergleich zur Injektionsmethode kaum (56,57,58). Die Titerhöhe lag nach der Inhalationsmethode etwas niedriger als nach der herkömmlichen subkutanen Impfung. Die Dauer des maximalen Titers und der Titerabfall waren jedoch bei beiden Impfmethoden gleich. Mit der Inhalationsmethode konnte bei einer Wiederholungsimpfung der gleiche immunisierende Effekt erzielt werden wie mit der subkutanen Impfstoffapplikation. Feldversuche bestätigten diese Ergebnisse (10). Auch eine Reihe russischer Autoren kam in ihren Arbeiten über die Wirksamkeit einer Diphtherievakzination mittels Aerosol zu dem gleichen Resultat (10).

2.5 Konjunktivale Immunisierung gegen Bakterientoxine

2.51 Konjunktivale Applikation von Tetanus-Toxin und Tetanus-Toxoid

Nach einer aktiven Immunisierung mittels konjunktivaler Applikation des Tetanus-Toxins ließen sich Antitoxine im Serum nachweisen (22). Dabei reagierte die Bindehaut der

Kaninchen auf die Behandlung mit Toxin nicht mit Entzündungserscheinungen und die Impflinge zeigten keine tetanischen Symptome.

Weniger gute Resultate erzielten RAMON und ZOELLER (50) durch das Einbringen von Tetanus-Anatoxin in den Lidbindehautsack bei Mensch und Kaninchen. Nach der Immunisierung waren nur schwache Antitoxintiter nachweisbar.

Nach intraokularer Revakzinierung mit Toxoidimpfstoff werden beim Kaninchen und auch beim Menschen gute Impferfolge beschrieben (74).

2.52 Konjunktivale Applikation von Diphtherie-Toxin und Diphtherie-Toxoid

GEBB (22) beschrieb die Bildung von Antitoxinen nach einer konjunktivalen Anwendung von Diphtherie-Toxin.

Durch Einträufeln von Diphtherie-Anatoxin in den Lidbindehautsack konnte ebenfalls eine leichte Immunität mit Anstieg der Serumantikörper hervorgerufen werden (50).

Eine Mischung aus Diphtherie- und Tetanus-Anatoxin hingegen führte mit dieser Impfmethode zu keiner Immunität.

Tabelle 1: Überblick über die Versuche zur Klärung der Resorptionsverhältnisse nach oraler Applikation von Tetanus-Toxin

Jahr	Autoren	Versuchsbedingungen	Versuchstier	Ergebnisse	
				Inaktivierung d. Toxins	Resorption d. Toxins
1898	Charrin, Lévêvre (13)	in vitro	--	ja, durch den Magensaft und die Bakterien des Dünndarmes	<u>nein</u>
1898	Ransom (52)	100000-fache tödliche Dosis	Meerschweinchen	<u>nein</u> , Toxin wird unverändert ausgeschied.	<u>nein</u>
1898	Nencki, Siebern, Schounow-Simonski (41)	in vitro	--	ja, durch den Magensaft, die Galle und den Pankreassaft	<u>nein</u>
1899	Carrière (11)	--	Kaninchen	ja, durch das Ptyalin und den Pankreassaft	<u>nein</u>
1906	Mc Clintock (38)	--	Meerschweinchen	nicht untersucht	<u>nein</u>
1906	Löwenstein (36)	200-fache bis 10 Mill.-fache tödliche Dosis	Maus	nicht untersucht	<u>nein</u>
1907	Vincent (65)	in vitro	--	ja, durch die Galle	<u>nein</u>

Fortsetzung siehe nächste Seite

Jahr	Autoren	Versuchsbedingungen	Versuchstier	Ergebnisse	
				Inaktivierung d. Toxins	Resorption d. Toxins
1908	Vincent (58)	nach Pylorusligatur Toxin per Sonde in den Magen	Meerschweinchen	ja, durch den Magen- saft	<u>nein</u>
1908	Vincent (69)	nach Dünndarmligatur 2000 doses mortelles in den oberen Dün- darm	Meerschweinchen und in vitro	ja, durch den Pan- kreas- und den Darmsaft	<u>nein</u>
1922	Dumas et al. (17)	4-malige Gabe extrem aktiven Toxins	Kaninchen	nicht untersucht	<u>nein</u>
1922	Dumas et al. (17)	2-malige Gabe extrem aktiven Toxins im Abstand von 24 Std.	Meerschweinchen	nicht untersucht	teilweise, nach 24 Std. generalis. Tetanus bei 4 v. 10 Tieren
1922	Dietrich (15)	intakter Magen-Darm- kanal	Maus	nicht untersucht	<u>nein</u>
1922	Dietrich (15)	Gallenreize-medikation	Maus	<u>nein</u>	ja, generalisierter Tetanus
1926	Ramon, Grasset (47)	2-malige hohe Toxin- gabe mittels Pipette im Abstand v. 3 Wochen	Kaninchen	nicht untersucht	teilweise, doch sehr schwache Immunität gebildet wird; keine Tetanus-symptome

Jahr	Autoren	Versuchsbedingungen	Versuchstier	Ergebnisse	
				Inaktivierung d. Toxins	Resorption d. Toxins
1926	Ramon, Grasset (47)	Gallepraemedikation	Kaninchen und Meerschweinchen	<u>nein</u>	<u>ja</u> , bei allen Tieren nach 24 Std. generalisierter Tetanus
1927	Ramon, Grasset (48)	sehr junge Tiere	Kaninchen und Meerschweinchen	<u>nein</u>	<u>ja</u> , bei allen Tieren generalisierter Tetanus
1927	Ramon, Grasset (48)	Galle-oder Rizinus- ölpraemedikation	Kaninchen und Meerschweinchen	<u>nein</u>	<u>ja</u> , bei allen Tieren generalisierter Tetanus
1927	Ramon, Grasset (48)	2-malige sehr hohe Toxingabe mittels Pipette im Abstand von 3 Wochen	Kaninchen und Meerschweinchen	teilweise Umwandlung des Toxins durch die Verdaunungssäfte in Anatoxin	teilweise, da schwache Immunität gebildet wird, keine Tetanussymptome
1936	Regamey (53)	--	Meerschweinchen	<u>ja</u> , durch Bindung an Nahrungsteile im Magen, durch Darminhalt, mikrob. Dickdarmflora, Adsorpt. im Dickdarm	<u>nein</u>

Tabelle 2: Überblick über die orale Immunisierung mit Toxoidimpfstoffen in den Jahren 1925 bis 1970

Jahr	Autoren	Antigen	Versuchsbedingungen	Versuchsobjekt	Impferfolge (Immunitätsnachweis) *
1925	Weinberg, Goy (71)	Botulinum-Anatoxin	1-malige Gabe von 50ccm Anatoxin	Kaninchen	++ (Antitoxinbestimmung)
1925	Weinberg, Goy (71)	Botulinum-Anatoxin	12 Tage lang 1mal tägl.	Meerschweinchen	+ (Antitoxinbestimmung)
1926	Ramon, Grasset (47)	Tetanus-Anatoxin Diphtherie-Anatoxin	Gallepraemedikation u. massive Antigendosen	Kaninchen und Meerschweinchen	(+)(Antitoxinbestimmung)
1926	Ramon, Zoeller (49)	Tetanus-Anatoxin Diphtherie-Anatoxin	vorherige subk. Grundimmunis., Gallepraemed., 2-3malige Antigengabe	Mensch	- (Antitoxinbestimmung)
1927	Ramon, Grasset (48)	Tetanus-Anatoxin Diphtherie-Anatoxin	sehr junge Tiere bzw. adulte mit Gallepraemed.	Kaninchen und Meerschweinchen	(+)(Antitoxinbestimmung)
1927	Nathan-LARRIER, Ramon, Grasset (40)	Tetanus-Anatoxin	neugeborene Tiere und vielfache Antigengaben	Kaninchen	+ (Antitoxinbestimmung)
1931	Welikanow (72)	Botulinum-Anatoxin	--	Kaninchen	- (Belastung)
1934	Welikanow (73)	Botulinum-Anatoxin	vorherige Sensibilisierung der Darmwand durch Eingabe von Dysenterieimpfstoff	Kaninchen	+++ (Antitoxinbestimmung)

* (+) sehr schwach + schwach ++ gut +++ sehr gut

- nicht nachweisbar

Fortsetzung siehe nächste Seite

Jahr	Autoren	Antigen	Versuchsbedingungen	Versuchsobjekt	Inferiorität (Immunitätsnachweis) *
1935	Lerétayer (35)	Tetanus-Anatoxin	Anatoxin über längere Zeit der Nahrung beigemischt	Kaninchen und Meerschweinchen	- (Antitoxinbestimmung)
1935	Jourevitch (77)	Diphtherie-Anatoxin	Individuen mit positiver Schick-Reaktion	Kaninchen	- (Antitoxinbestimmung)
1937	Hamada (28)	Diphtherie-Anatoxin	Gallepräsedifikation	Kaninchen und Meerschweinchen	- (Antitoxinbestimmung)
1945	Pousfield (7)	Diphtherie-Toxoid	vorherige subk. Grundimmunis., 100Lf/Person	Mensch	+++ (Antitoxinbestimmung)
1945	Bousfield (7)	Diphtherie-Toxoid	Individuen mit posit. Schick-Reakt., 100Lf/Pers.	Mensch	- (Antitoxinbestimmung)
1947	Petrini (43)	Diphtherie-Toxoid	vorherige subk. Grundimmunis., 100Lf/Person	Mensch	+++ (Antitoxinbestimmung)
1948	Masucci, Gold, de Falco (37)	Diphtherie-Toxoid	vorherige subk. Grundimmunis., 100Lf/Person	Mensch	+++ (Antitoxinbestimmung)
1948	Masucci, Gold, de Falco (37)	Diphtherie-Toxoid	Individuen mit posit. Schick-Reakt., 100Lf/Pers.	Mensch	- (Antitoxinbestimmung)
1950	Greenberg, Detlor, Gibbard (26)	Diphtherie-Toxoid	vorherige subkutane Grundimmunisierung	Meerschweinchen	+++ (Antitoxinbestimmung)

* (+) sehr schwach

++ gut

+++ sehr gut

- nicht nachweisbar

Fortsetzung siehe nächste Seite

Jahr	Autoren	Antigen	Versuchsbedingungen	Versuchsobjekt	Impferfolg (Immunitätsnachweis) *
1950	Greenberg, Detlor, Gibbard (26)	Diphtherie-Toxoid	orale Toxoidgabe als Grundimmunisierung	Meerschweinchen	++ (Belastung)
1950	Mc Quarrie, Moloney (39)	Diphtherie- und Tetanus-Toxoid kombiniert	Toxoidgabe sowohl als Grundimmunisierung als auch als Booster	Meerschweinchen	++ (Antitoxinbestimmung)
1950	Greenberg, Fleming (27)	Diphtherie-Toxoid	vorherige subk. Grundimmunis., mehrmalige orale Toxoidgaben, insgesamt 16000Lf/Pers.	Mensch	+ (Antitoxinbestimmung)
1950	Greenberg, Fleming (27)	Tetanus-Toxoid	vorherige subk. Grundimmunis., mehrmalige orale Toxoidgaben, insgesamt 2560Lf/Pers.	Mensch	(+) (Antitoxinbestimmung)
1950	Greenberg, Fleming (27)	Diphtherie-Toxoid	mehrmalige orale Toxoidgaben als Grundimmunis., insges. 8000Lf/P.	Mensch	- (Antitoxinbestimmung)
1952	Katitch (32)	Rotulinum-Anatoxin	Toxoid 30 Tage lang als Ersatz für die Tränke	Mäuse, Ratten Meerschweinchen	- (Belastung)
1961	Cockburn, Bradstreet, Bailey, Ungar (14)	Diphtherie-Toxoid	vorherige subk. Grundimmunisierung, 2x1500Lf Toxoid + 2x1500 Hyaluronidase pro Person	Mensch	+++ (Antitoxinbestimmung)

* (+) sehr schwach + schwach ++ gut +++ sehr gut
 - nicht nachweisbar

Fortsetzung siehe nächste Seite

Jahr	Autoren	Antigen	Versuchsbedingungen	Versuchsobjekt	Immerfolg (Immunitätsnachweis) *
1962	Zuhns (34)	Diphtherie-Toxoid	Individuen mit neg. Schick-Reaktion, mehrmalige orale Toxoidgaben, insgesamt 40000Lf/Person	Mensch	- (Antitoxinbestimmung)
1963	N.N. (42) Report by the Public Health Laborat. Service	Diphtherie-Toxoid	vorherige subk. Grundimmunisierung, 2x1500Lf Toxoid + 2x1500 E. Ryaluronidase/Person	Kinder	++ (Antitoxinbestimmung)
1970	Jansen, Knoetze, Visser (31)	Botulinum-Toxoid	mehrfache hohe Dosen konz. Toxoid in monatl. Intervall.	Kaninchen	- (Antitoxinbestimmung)
1970	Jansen, Knoetze, Visser (31)	Botulinum-Toxoid	vorherige subk. Grundimmunisierung, Anfangstititer muß unter 100 J.E./ml sein	Kaninchen	++ (Antitoxinbestimmung)
1970	Veronesi, Corrêa, Tavares (64)	Tetanus-Toxoid	Toxoidgabe sowohl als Grundimmunis. als auch als Booster, 4mal. Toxoidapplik.	Meerschweinchen	+++ (Antitoxinbestimmung)
1970	Veronesi, Corrêa, Tavares (64)	Tetanus-Toxoid ^a	vorherige subk. Grundimmunisierung, 1mal. Toxoidapplik. 708Lf/P.	Mensch	+++ (Antitoxinbestimmung)
1970	Veronesi, Corrêa, Tavares (64)	Tetanus-Toxoid	mehrmalige orale Toxoidgaben als Grundimmunisierung insgesamt 4248 Lf/Person	Mensch	++ (Antitoxinbestimmung)

* (+) sehr schwach + schwach ++ gut +++ sehr gut
- nicht nachweisbar

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.11 Versuchstiere

Es wurden NMRI-Mäuse beiderlei Geschlechts mit einem durchschnittlichen Gewicht von 16 bis 18 Gramm bei Versuchsbeginn verwendet. Die Mäuse wurden in Gruppen von jeweils 10 Tieren in Makrolonkäfigen gehalten. Die Fütterung erfolgte mittels Pellets der Fa. ALTROMIN, Lage/Lippe, die Tränke bestand aus in Tropfflaschen abgefülltem Leitungswasser. Beides wurde ad libitum angeboten.

Die Kontrolltiere lebten unter den gleichen Bedingungen.

3.12 Impfstoff

Zur Immunisierung verwendeten wir ein Tetanus-Toxoid-Konzentrat (K. Nr. 569) der Fa. BEHRINGWERKE AG, Marburg/Lahn. Es enthielt 1000 Lf ¹⁾ pro ml.

3.13 Immunisierung

Die Einzeldosis bei der oralen Applikation des Impfstoffes betrug mit wenigen Ausnahmen 200 Lf, bei der subkutanen Impfung dagegen nur 2 Lf Tetanus-Toxoid. Die Toxoid-

1) Lf = Limes flocculationis = Flockungseinheit. Sie entspricht der Toxinmenge, die von 1 I.E. Tetanus-Antitoxin neutralisiert wird.

Dosis wurde in der Regel in 0,5 ml verabreicht, und zwar auf folgende Arten:

1. Oesophagus: Der Impfstoff wurde mit der Schlundsonde eingegeben, wobei zwei Sonden verschiedener Länge zur Anwendung kamen. Sonde A reichte bei maximalem Einführen bis zum Übergang des oberen in den mittleren Teil des Oesophagus, Sonde B dagegen bis kurz vor den Mageneingang der Versuchstiere. Als Sonde diente uns eine in der Mitte im stumpfen Winkel abgebogene und an der Spitze abgeschliffene Kanüle.
2. Mundhöhle: Mittels Sonde C, einer ebenfalls in der Mitte abgebogenen, kurzen Knopfkanüle, wurde das Toxoid in die Mundhöhle geträufelt.
3. Trinkwasser: Das Toxoid wurde, mit Trinkwasser verdünnt, den Tieren in normalen Tränkeflaschen zum Trinken angeboten. Die Flüssigkeitsmenge war so bemessen, daß das Toxoid innerhalb von 24 Stunden aufgenommen wurde. 24 Stunden zuvor wurde den Mäusen das Trinkwasser entzogen, um eine sichere und rasche Aufnahme der Vakzine zu erreichen.

Auch die Darreichung des unverdünnten Toxoids erfolgte in Tränkeflaschen und nach vorausgegangener 24-stündiger Dürstperiode. Es wurde darauf geachtet, daß das Toxoid in ausreichender Menge zur Aufnahme bereitstand.

4. Zucker: Das Toxoid wurde auf Zuckerwürfel geträufelt und den Tieren an Stelle des ALTROMIN zum Fressen angeboten. Die Zuckermenge war so bemessen, daß das Toxoid innerhalb von 24 Stunden aufgenommen wurde. Zur Gewährleistung einer sicheren und raschen Aufnahme wurde den Mäusen 24 Stunden vor der Impfstoffgabe die Nahrung entzogen.
5. subkutan: Parallel zu den oral vakzinierten untersuchten wir parenteral immunisierte Tiere. Die parenterale Impfstoffapplikation erfolgte in Form von subkutanen Injektionen in die Kniefalte.

3.14 Belastungsversuche

Am 18. Tage nach der letzten Immunisierung wurden jeweils 20 Tiere einer jeden Impfgruppe einer Testinfektion unterzogen. Die Belastung der Mäuse erfolgte subkutan mit einem Tetanus-Toxin der Fa. BEHRINGWERKE AG, Marburg/Lahn. Das in getrocknetem Zustand vorliegende Toxin wurde bei +4 Grad Celsius unter Vermeidung von Lichteinwirkung aufbewahrt.

Die LD₅₀ des Toxins wurde an Mäusen bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach der Methode von REED und MUENCH. Die Belastungsdosis betrug in allen Versuchen 10 LD₅₀.

- 1) LD₅₀ = Letale Dosis = die Dosis, bei der 50 % eines Tierkollektivs innerhalb eines bestimmten Zeitraumes sterben.

Parallel zu den Impfungen prüften wir jeweils ungeimpfte, gleichaltrige und gleichschwere Kontrollen. Die Testinfektionsmenge war so eingestellt, daß in allen Belastungsversuchen 100 % der Kontrolltiere innerhalb von zwei Tagen starben.

3.15 Auswertung der Belastungsversuche

Der Verlauf der Testinfektion wurde von uns über eine Dauer von vier Tagen beobachtet.

Die Beurteilung der Testinfektion erfolgte nach folgenden Kriterien:

Tiere, die während der viertägigen Beobachtungszeit keine ausgeprägten, für einen lokalen oder generalisierten Tetanus typischen Symptome zeigten und deren Allgemeinbefinden in dieser Zeit nicht gestört war, galten als immun. Traten jedoch bei den Impfungen tetanische Symptome in Form geringgradiger bis starker Lahmheit der Hinterextremität bzw. Zeichen eines generalisierten Starrkrampfes auf oder kamen die Tiere innerhalb von vier Tagen durch die Testinfektion zu Tode, so wurden sie von uns als nicht immun bezeichnet. Letzteres war bei den ungeimpften Kontrollen ausnahmslos der Fall.

Den durch die orale Immunisierung erzielten Wirksamkeitsindex (W) berechneten wir nach folgender Formel:

$$W = \frac{a - b}{a} \cdot 100$$

a = Zahl der belasteten Mäuse

b = Zahl der nach der Belastung gestorbenen Mäuse

3.16 Serumgewinnung

Das für die serologischen Untersuchungen benötigte Blut wurde durch Dekapitation der Tiere gewonnen. Zu diesem Zwecke töteten wir am 18. Tage nach der letzten Impfstoffgabe jeweils 10 Impflinge pro Versuchsgruppe. Das Blut von fünf Mäusen wurde gepoolt, so daß wir pro Versuchsgruppe je ein Serumpaar erhielten.

Auf gleiche Weise wurde das Serum derjenigen Versuchstiere gewonnen, die am achten Tage nach der Belastung noch am Leben waren.

Die Lagerung der Seren erfolgte bis zum Zeitpunkt der Auswertung bei -20 Grad Celsius.

3.17 Antitoxinbestimmung

Das Serum eines Teils der geimpften Tiere untersuchten wir auf den Gehalt an Serumantitoxinen. Die Bestimmung des Tetanus-Antitoxintiters in Internationalen Einheiten (I.E.) wurde nach der $L_+^{1)}$ -Methode durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich der Totwerte der mit dem zu prüfenden Antitoxin injizierten Tiere mit den Totwerten der mit dem Standard-Antitoxin injizierten Kontrolltiere.

Der Mittelwert eines Pools galt als Antitoxintiter. Als Standard verwendeten wir ein Tetanus-Antitoxinserum mit einem Titer von 10 I.E. pro ml, das uns von der Fa. BEH-

1) L_+ - Dosis = Limes mortis = die Toxinmenge, die mit 1 I.E. Antitoxin gemischt, eine Maus in 96 Stunden tötet.

RINGWERKE AG, Marburg/Lahn, zur Verfügung gestellt wurde. Pro Serumverdünnung wurde eine Maus angesetzt. Alle geprüften Seren mit einem Titer unter 0,02 I.E. pro ml wurden als negativ bewertet.

3.2 ERGEBNISSE

3.21 Ergebnis der Belastungsversuche nach einmaliger Applikation des Tetanus-Toxoids

Zunächst mußte geklärt werden, ob eine orale Immunisierung mit Tetanus-Toxoid bei der Maus grundsätzlich möglich ist, d.h. ob eine Resorption des Tetanus-Toxoids über die Schleimhäute des Verdauungstraktes überhaupt stattfindet.

In Anlehnung an die Untersuchungen von RAETTIG(46) mit Typhus-Antigen applizierten wir das Toxoid mittels Sonde A in einer Dosis, die 100 mal größer war, als die für eine erfolgreiche parenterale Impfung benötigte Impfmenge. Durch den Gebrauch der Schlundsonde sollte die sichere Aufnahme einer bestimmten Impfstoffdosis gewährleistet werden. Bei richtigem Einführen der Sonde ließ sich der Impfstoff leicht und ohne Druck aus der aufgesetzten Tuberkulinspritze in die Speiseröhre entleeren. Das Allge-

meinbefinden der Tiere blieb während und nach der Impfung ungestört. Zur Kontrolle und zum Vergleich ließen wir eine nach der üblichen subkutanen Methode geimpfte Gruppe parallel laufen. Die Impfstoffdosis pro Tier betrug hierbei 2 Lf Tetanus-Toxoid.

Beide Tiergruppen wurden 18 Tage nach der Schutzimpfung durch die subkutane Injektion von 10 LD₅₀ Tetanus-Toxin testinfiziert. Der Wirksamkeitsindex der über Sonde A geimpften Mäuse betrug 55, der nach der einmaligen subkutanen Schutzimpfung dagegen 90 (Abbildung 1).

Somit war bewiesen, daß eine orale Immunisierung mit Tetanus-Toxoid bei der Maus grundsätzlich möglich ist. Wir versuchten nun, durch Wiederholungsimpfungen, Erhöhung der Einzeldosis und Variierung der Applikationsart die Wirkung der oralen Immunisierung zu steigern.

3.22 Ergebnis der Belastungsversuche nach mehrmaliger Applikation des Tetanus-Toxoids

Bei einer gleichbleibenden Einzeldosis von 200 Lf prüften wir zunächst folgende Impfschemen:

1. eine zweimalige Impfung mit Sonde A im Abstand von 15 Tagen,
2. eine dreimalige Impfung mit Sonde A an drei aufeinanderfolgenden Tagen,
3. eine dreimalige Impfung mit Sonde A im Abstand von drei Tagen.

Als Kontrollgruppe dienten parenteral geimpfte Mäuse, die zweimal im Abstand von 15 Tagen 2 Lf Tetanus-Toxoid subkutan verabreicht bekamen. In dieser Kontrollgruppe überlebten alle Tiere einen Challenge von 10 LD₅₀ Tetanus-Toxin. Den gleichen Wirksamkeitsindex von 100 erreichten wir durch die dreimalige orale Immunisierung im Abstand von jeweils drei Tagen.

Der Impfrhythmus und die Zahl der Impfstoffapplikationen scheinen für den Erfolg einer oralen Immunisierung besonders wichtig zu sein, d.h. der Impferfolg läßt sich durch Variierung dieser beiden Größen sowohl verbessern als auch verschlechtern. So erzielten wir bei der dreimal an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführten Impfung nur einen Wirksamkeitsindex von 75 und bei den zweimal im Abstand von 15 Tagen geimpften Mäusen lag er bei 65.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 1 zusammengestellt.

3.23 Ergebnis der Belastungsversuche nach einmaliger Applikation des Tetanus-Toxoids bei verschiedenen Funktionszuständen des Magen-Darm-Kanals

Bei den obigen Untersuchungen hatten die Versuchstiere vor der Impfstoffapplikation Futter und Wasser ad libitum erhalten. Möglicherweise üben jedoch der Füllungszustand des Magens und des Darmes einen Einfluß auf die Wirksam-

keit und Verträglichkeit einer oralen Tetanusimmunisierung aus. Um dies abzuklären, impften wir drei verschiedene Gruppen einmal oral über Sonde A mit 200 Lf Tetanus-Toxoid. Die Impflinge der Gruppe 1 erhielten bis zur Impfung Futter und Trinkwasser wie gewohnt; der Gruppe 2 wurde 24 Stunden vorher das Futter entzogen. Den Tieren der Gruppe 3 standen 24 Stunden vor der Immunisierung weder Wasser noch Futter zur Verfügung.

Der Wirksamkeitsindex der ad libitum gefütterten Versuchstiere der Gruppe 1 lag bei 55, der der Gruppe 2 bei 40 und der der Gruppe 3 bei 30 (Abbildung 2).

3.24 Ergebnis der Belastungsversuche nach einmaliger Applikation des Tetanus-Toxoids mit verschiedenen Impfstoffdosen und Impfstoffvolumina

In unseren bisherigen Versuchen hatten wir als Einzeldosis für die orale Immunisierung 200 Lf Tetanus-Toxoid pro Tier gewählt, die ausnahmslos in 0,5 ml verabreicht wurden. Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollten klären, inwieweit Wirksamkeit und Verträglichkeit durch unterschiedliche Impfstoffdosierungen und Impfstoffvolumina beeinflusst werden. Die Tiere wurden alle einer einmaligen Vakzination über Sonde A unterzogen. Die Dosis pro Tier betrug in der

1. Gruppe 50 Lf Toxoid in 0,2 ml,
2. Gruppe 100 Lf Toxoid in 0,2 ml,
3. Gruppe 200 Lf Toxoid in 0,2 ml,

4. Gruppe 200 Lf Toxoid in 0,5 ml und in der
5. Gruppe 400 Lf Toxoid in 0,5 ml.

Die Wirksamkeitsindices der einzelnen Tiergruppen stiegen von 30 in der ersten über 35 in der zweiten und 40 in der dritten auf 55 in der vierten und 65 in der fünften Gruppe. Unterschiedliche Impfstoffdosierungen bei gleichbleibendem Impfstoffvolumen sowie unterschiedliche Impfstoffvolumina bei gleichbleibender Dosierung beeinflussen die Wirksamkeit des oral applizierten Tetanus-Toxoids (Abbildung 3).

3.25 Ergebnis der Belastungsversuche nach einmaliger Applikation des Tetanus-Toxoids bei verschiedenen Applikationsarten

Um den optimalen Applikationsmodus für die orale Tetanusimmunisierung bei der Maus zu finden, haben wir in den folgenden Versuchen den Tieren eine einheitliche Toxoidmenge von 200 Lf

1. mit Sonde B in den Oesophagus direkt vor den Magen-
eingang,
2. mit Sonde C in die Mundhöhle,
3. über das Trinkwasser und
4. über Zuckerwürfel verabreicht.

Bei Versuch 1 und 2 wurde der Impfstoff auf einmal eingegeben. In beiden Versuchen betrug die Impfstoffmenge 0,2 ml. In den Versuchen 3 und 4 konnten die Tiere das

Toxoid in einem Zeitraum von 24 Stunden selbständig aufnehmen. Pro Tier standen 0,2 ml Toxoid mit 200 Lf in 5 ml Leitungswasser bzw. auf Zuckerwürfel geträufelt zur Verfügung.

Eine parenteral geimpfte Kontrollgruppe lief parallel. Die Mäuse der Gruppe 3 und 4 nahmen den Impfstoff trotz vorausgegangenem 24-stündigem Trinkwasser- bzw. Futterentzug nur zögernd auf. Nach der Belastungsinfektion starben alle innerhalb von 24 Stunden. Der Wirksamkeitsindex von den über Sonde B (lange Schlundsonde) in den Oesophagus geimpften Tieren der Gruppe 1 betrug 20, von den über Sonde C geimpften der Gruppe 2 dagegen 65. Bei den subkutan vakzinierten Tieren war der Wirksamkeitsindex 90 (Abbildung 4).

Der krasse Unterschied im Immunisierungserfolg zwischen den Gruppen 1 und 2 einerseits und den Gruppen 3 und 4 andererseits überraschte. Selbst bei einer Toxoiddosis von 3000 Lf pro Tier, welches einer 15-fachen Erhöhung der Dosis entspricht, konnte nach einer Verabreichung über die Tränkeflasche keine belastbare Immunität erzielt werden (Abbildung 4).

3.26 Ergebnis der Verträglichkeitsprüfung des oral applizierten Tetanus-Toxoids

Die Versuchstiere wurden nach oraler Immunisierung täglich auf ihr Allgemeinbefinden und eventuell auftretende Krankheitssymptome hin untersucht.

Unabhängig von der Applikationsart und der Höhe der Dosierung des per os verabfolgten Impfstoffes beobachteten wir bei keinem der von uns immunisierten Tiere auch nur die geringste Störung des Allgemeinbefindens. Alle Mäuse blieben nach der Vakzinierung klinisch gesund und standen den parallel laufenden ungeimpften Kontrolltieren weder in der Futteraufnahme noch im Wachstum in irgendeiner Weise nach. Das Gleiche galt für revakzinierter Tiere.

3.27 Ergebnis der Antitoxinbestimmungen nach einmaliger Toxoidapplikation

Die Ergebnisse der Antitoxinuntersuchungen gepoolter Serumproben nach einmaliger oraler Impfung im Vergleich zur subkutanen Toxoidapplikation sind in Abbildung 5 zusammengestellt.

Die Antitoxinwerte vor der Belastung sind die Folge der Impfung. Sie korrelieren eng mit den im Belastungsversuch gewonnenen Werten. Nach dem Toxin-Challenge steigen die Antitoxintiter durchwegs an.

Bei Mäusen, die den Impfstoff über das Trinkwasser oder über Zuckerwürfel selbständig aufnehmen konnten, waren keine Antitoxine nachweisbar. Dabei spielte es keine Rolle, ob nur 200 Lf oder 3000 Lf Tetanus-Toxoid pro Maus verabreicht wurden.

In den anderen Versuchsgruppen wurden im Serum der Impf-

linge vor der Belastung Antitoxinwerte um 0,05 I.E. pro ml und nach der Belastung um 0,5 I.E. pro ml erreicht. Ein grundlegender Unterschied zur Antitoxinbildung bei subkutan geimpften Tieren trat nicht in Erscheinung.

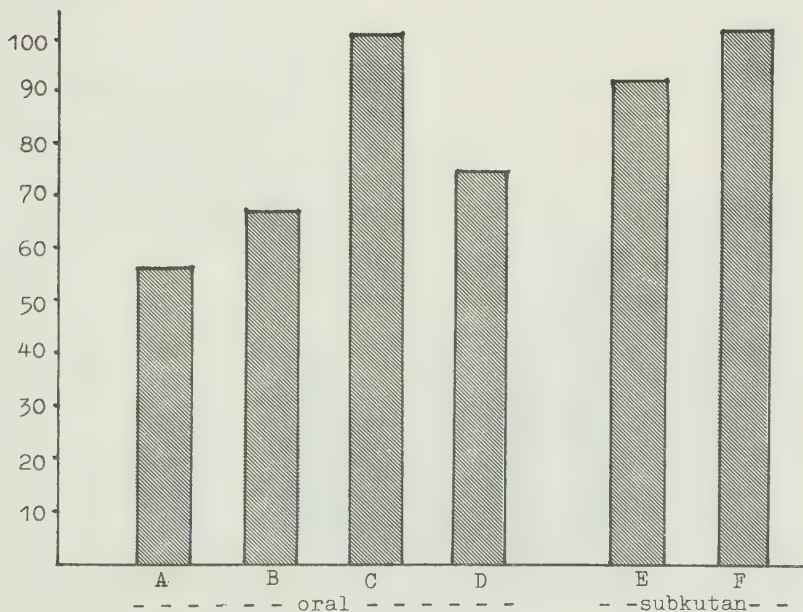
3.28 Ergebnis der Antitoxinbestimmungen nach mehrmaliger Toxoidapplikation

Bei den Wiederholungsimpfungen verschob sich das Antitoxinbild zugunsten der parenteralen Impfung. Nach einer zweimal im Abstand von 15 Tagen durchgeführten subkutanen Immunisierung stieg der Serumantitoxintiter stark an und lag sowohl vor als auch nach der Belastung weit über 5 I.E. pro ml. Eine dreimalige Vakzinierung mittels Schlundsonde im Abstand von drei Tagen bewirkte einen Anstieg auf 0,5 I.E. pro ml vor und ca. 1,3 I.E. pro ml nach dem Challenge. Diese Werte wurden von den dreimal an drei aufeinanderfolgenden Tagen und zweimal im Abstand von 15 Tagen geimpften Gruppen nicht erreicht. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse zeigt Abbildung 6.

Abb. 1: Wirksamkeit einer Immunisierung von Mäusen mit Tetanus-Toxoid mittels Schlundsonde (Sonde A)

Impfschema		Einzel-dosis in Lf	Zahl der ge- impften Mäuse	Wirksam- keitsindex
oral	1-mal (A)	200	60	55
	2-mal im Abstand von 15 Tagen (B)	200	20	65
	3-mal im Abstand von 3 Tagen (C)	200	20	100
	3-mal an 3 auf- einanderfolgen- den Tagen (D)	200	20	75
sub- kutan	1-mal (E)	2	20	90
	2-mal im Abstand von 15 Tagen (F)	2	20	100

Wirksamkeits-
index



A,B,C,D,E,F : siehe obige Tabelle

Abb. 2: Wirksamkeit einer Immunisierung von Mäusen mit Tetanus-Toxoid mittels Schlundsonde (Sonde A) bei verschiedenen Funktionszuständen des Magen-Darm-Kanals

Ernährung vor der Immunisierung	Einzeldosis in Lf	Zahl der belasteten Mäuse	Wirksamkeitsindex
Futter und Wasser ad libitum	200	20	55
24 Stunden vor der Impfung kein Futter aber Wasser	200	20	40
24 Stunden vor der Impfung kein Futter und kein Wasser	200	20	30

Wirksamkeits-
index

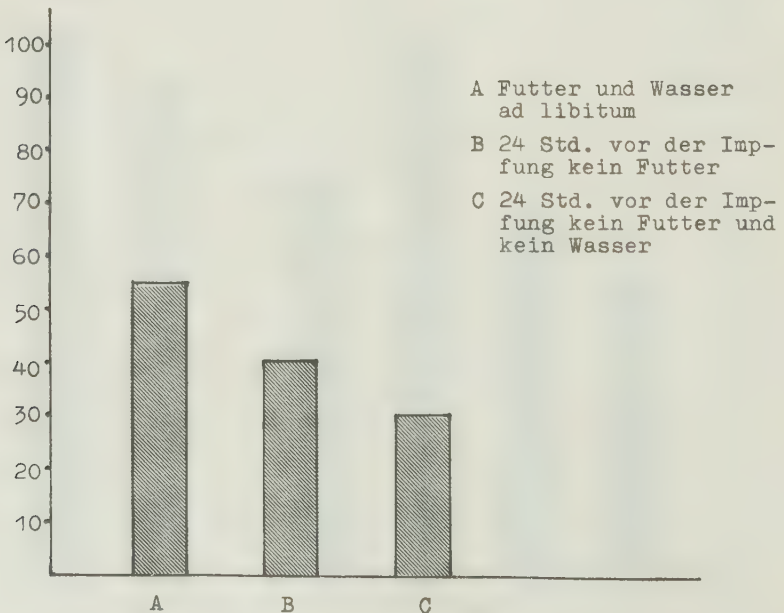


Abb. 3: Wirksamkeit einer Immunisierung von Mäusen mit Tetanus-Toxoid mittels Schlundsonde (Sonde A) bei unterschiedlichen Impfstoffdosen und Impfstoffvolumina

Einzel-dosis in Lf	Impfstoffvolumen in ml	Zahl der ge- impften Mäuse	Wirksamkeits- index
50	0,2	20	30
100	0,2	20	35
200	0,2	20	40
200	0,5	20	55
400	0,5	20	65

Wirksamkeits-
index

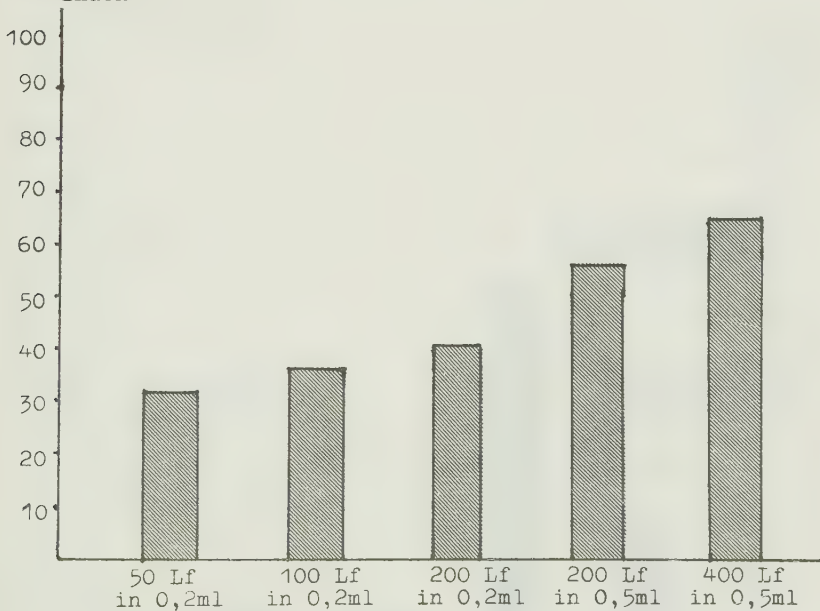


Abb. 4: Wirksamkeit einer Immunisierung von Mäusen mit Tetanus-Toxoid bei unterschiedlicher Applikation des Impfstoffes

Applikationsmodus	Einzeldosis in Lf	Zahl der ge- impften Mäuse	Wirksamkeits- index
Sonde B - Oesophagus bis kurz vor den Mageneingang	200 Lf in 0,2 ml	20	20
Sonde C - direkt in die Mundhöhle	200 Lf in 0,2 ml	20	65
Trinkwasser	200 Lf in 5 ml	20	0
	3000 Lf	20	0
Zuckerwürfel	200 Lf in 0,2 ml	20	0

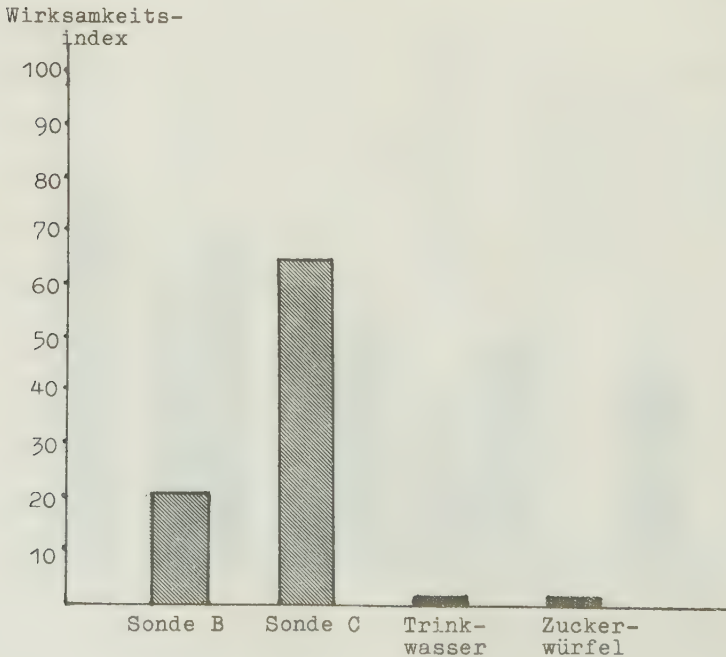


Abbildung 5: Überblick über den Antitoxingehalt von Mäuseren nach einer einmaligen unterschiedlichen

Immunisierung mit Tetanus-Toxoid vor und nach der Belastung mit Tetanus-Toxoid

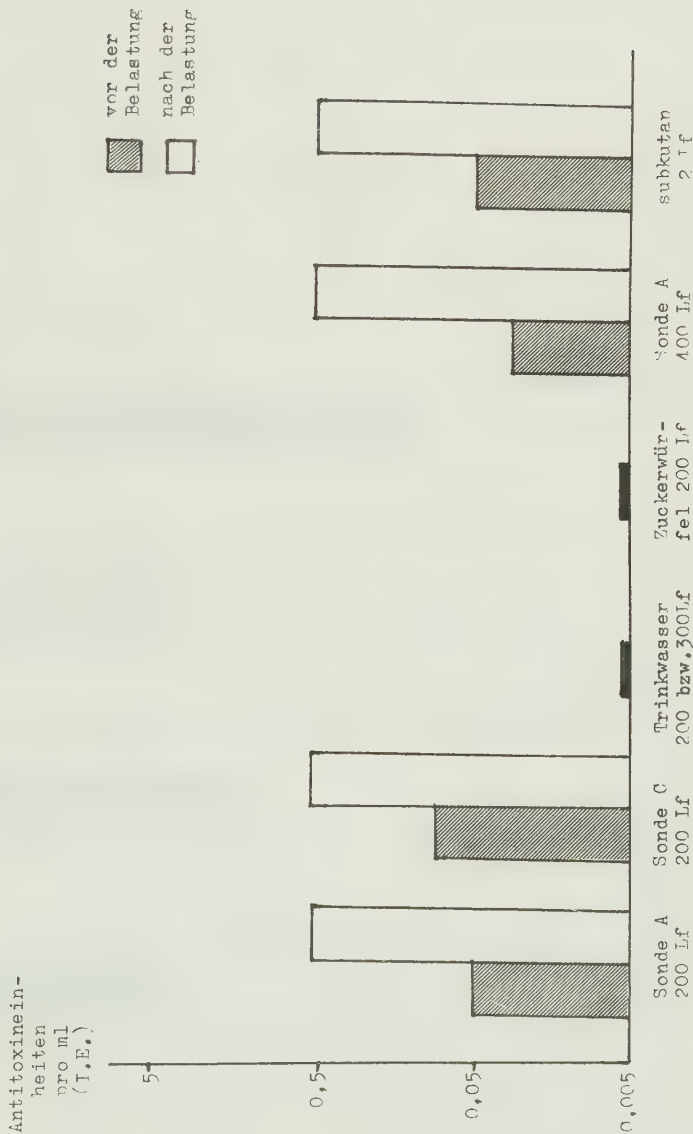
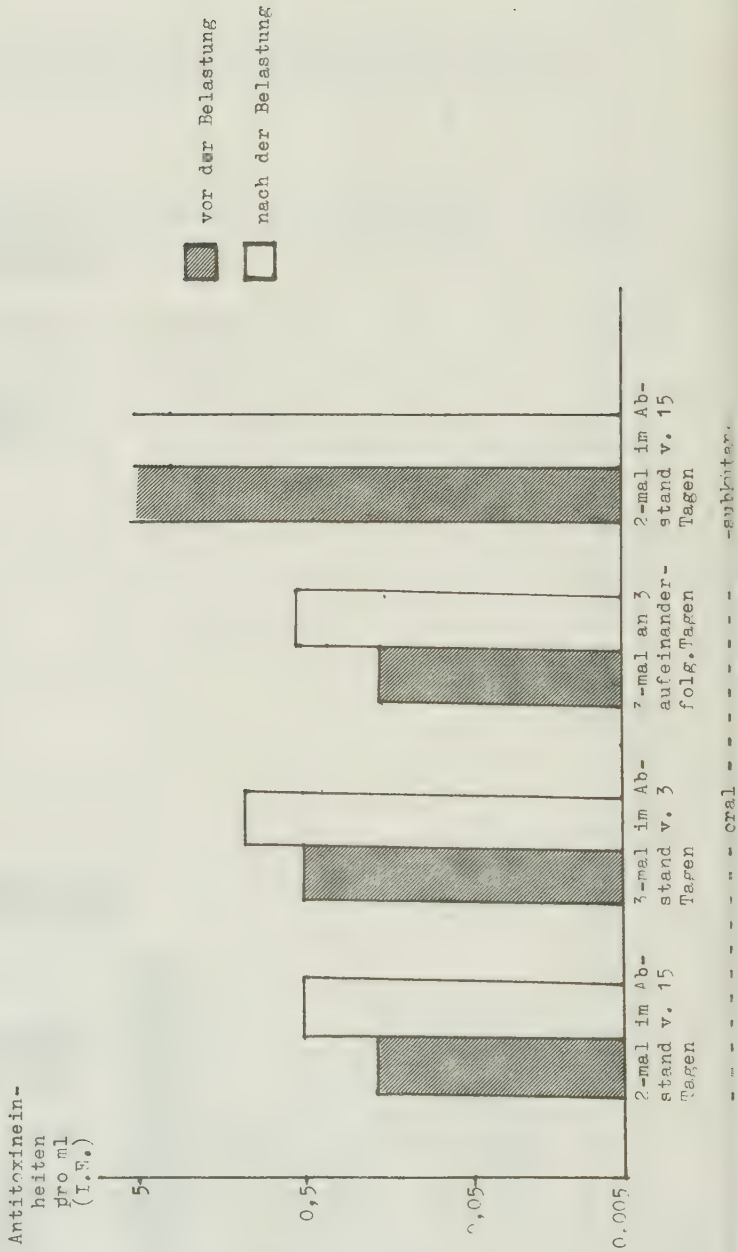


Abbildung 6: Überblick über den Antitoxingehalt von Mäuseren nach einer mehrmaligen unterschiedlichen Immunisierung mit Tetanus-Toxoid vor und nach der Belastung mit Tetanus-Toxin



4. B E S P R E C H U N G D E R E R G E B N I S S E

Im Rahmen dieser Untersuchungen wollten wir folgende Einzelfragen klären:

1. Immunisiert das per Schlundsonde applizierte Tetanus-Toxoid?
2. Verbessern orale Revakzinationen den Impfschutz und spielen die Intervalle zwischen den einzelnen Impfungen eine Rolle?
3. Ändert sich der Wirksamkeitsindex mit verschiedenen Impfstoffkonzentrationen und verschiedenen Impfstoffvolumina?
4. Wirken sich die verschiedenen Funktionszustände des Verdauungskanal auf den Erfolg der oralen Vakzinierung aus?
5. Beeinflussen verschiedene Applikationsarten das Immunisierungsergebnis nach oraler Toxoidverabreichung?
6. Bestehen Hinweise auf eine Unverträglichkeit des oral applizierten Toxoids?
7. Ist ein Zusammenhang zwischen belastbarer Immunität und dem Auftreten von Serumantitoxinen zu erkennen?

Die durchgeführten Untersuchungen berechtigen uns zu der Aussage, daß eine orale Immunisierung von Mäusen gegen eine Tetanusinfektion grundsätzlich möglich ist. Durch eine einmalige orale Impfung erreichten wir einen Wirk-

samkeitsindex von 55, nach einmaliger subkutaner Toxoidapplikation dagegen einen Wirksamkeitsindex von 90. Für die Immunisierung mit der Schlundsonde wurde die 100-fache subkutane Impfstoffkonzentration verwendet. Die Immunität ließ sich durch eine zweimalige sowie durch eine dreimalige Toxoidgabe erhöhen. Das beste Ergebnis wurde durch die dreimalige orale Impfstoffverabreichung im Abstand von drei Tagen erzielt. Es entspricht dem nach zweimaliger subkutaner Toxoidapplikation. In beiden Fällen waren alle geimpften Tiere gegen eine tödliche Dosis Tetanus-Toxin geschützt.

Wir wissen auch aus anderen Untersuchungen über die orale Impfstoffapplikation, daß Wiederholungsimpfungen einen stärkeren Einfluß auf den Impferfolg ausüben als die Erhöhung der Einzeldosis. Für nicht vermehrungsfähige, bakterielle Vollantigene hat RAETTIG (46) eine zehnmalige Immunisierung an zehn aufeinanderfolgenden Tagen als bestes Immunisierungsverfahren erarbeitet. Wir erreichten schon durch eine dreimalige, im Abstand von drei Tagen durchgeführte Immunisierung mit der Schlundsonde einen Wirksamkeitsindex von 100. Dieses Immunisierungsergebnis wurde bisher nach keiner oralen Vakzinierung mit nicht vermehrungsfähigen Antigenen erreicht.

Unterschiedliche Impfstoffdosierungen verändern die Wirksamkeit einer oralen Immunisierung. Je niedriger die Toxoid-Konzentration im Impfstoff, um so schlechter wird das Immunisierungsergebnis. Bei einer Erhöhung der Ein-

zeldosis auf über 200 Lf steigt der Wirksamkeitsindex aber nur noch sehr langsam an, so daß man annehmen kann, daß ab einer bestimmten Grenzdosis eine Erhöhung der Antigenmenge zu keiner weiteren Steigerung der Wirksamkeit führt.

Der Wirksamkeitsindex bei Mäusen, die mit 200 Lf Tetanus-Toxoid in 0,2 ml immunisiert worden waren, liegt um 10 bzw. 15 niedriger als derjenige von Tieren, die 200 Lf Toxoid in 0,5 ml erhalten hatten. Dieses Ergebnis spricht für eine Resorption des Tetanus-Toxoids über die Schleimhäute des oberen Verdauungstrakts. Wir haben an laparotomierten Mäusen festgestellt, daß der Magen mit 0,2 ml stark gefüllt ist, 0,5 ml aber unter keinen Umständen fassen kann. Bei einer oralen Applikation von 0,5 ml gelangt also sicher ein Teil des Toxoids durch Regurgitation zurück in die Mundhöhle - eventuell bis zu den Schleimhäuten des oberen Respirationstraktes. Bei einer Impfstoffmenge von 0,2 ml ist die Wahrscheinlichkeit einer Regurgitation sehr viel geringer und damit auch der Immunisierungseffekt schlechter.

Die Ergebnisse der Immunisierungsversuche mit Mäusen in unterschiedlichen Fütterungszuständen bestätigen diese Theorie. Die ad libitum gefütterte Gruppe erreichte den höchsten Wirksamkeitsindex und nicht die Gruppe der Tiere, die 24 Stunden vor der Impfstoffgabe kein Wasser und kein Futter mehr erhalten hatten. Die Ursache ist darin zu

suchen, daß ein Tier mit vollem Magen den Impfstoff häufiger regurgitiert als dies bei einem Tier mit leerem Magen der Fall ist.

Für eine Resorption des Antigens über die Schleimhäute des oberen Verdauungs- und Respirationstraktes sprechen auch die Resultate nach der Impfstoffapplikation über die Sonden B und C. Die einmalige Verabreichung von 200 Lf Toxoid in 0,2 ml über Sonde B erbrachte einen Wirksamkeitsindex von nur 20. Da diese Sonde bis kurz vor die Cardia des Magens reichte und die Impfstoffmenge nur 0,2 ml betrug, war die Möglichkeit einer Impfstoffregurgitation auf ein Minimum herabgesetzt. Nach einmaliger Verabreichung von 200 Lf Tetanus-Toxoid in 0,2 ml über Sonde C war der Wirksamkeitsindex dagegen 65. Durch Sonde C wurde der Impfstoff tropfenweise in die Mundhöhle verbracht. Die Tiere sträubten sich gegen das Abschlucken der Toxoidlösung und behielten sie oftmals längere Zeit in der Mundhöhle. Der Impfvorgang zog sich bei jeder Maus über mehrere Minuten hin. Die Verweildauer des Antigens in der Mundhöhle war also genügend groß, um dieses über die Mund- und Nasenschleimhäute zur Resorption gelangen zu lassen. So konnte sich dieser für eine einmalige orale Immunisierung hervorragende Impfschutz ausbilden. GREENBERG und FLEMING (27) hatten zwar in ihren Untersuchungen die Vermutung geäußert, das Tetanus-Toxoid

entwickle seine Aktivität im Darm; die Ergebnisse waren jedoch nach eigenen Angaben weder eindrucksvoll noch überzeugend und die Zahl der Versuchspersonen viel zu gering, um statistisch signifikante Schlüsse ziehen zu können.

Die negativen Ergebnisse nach einer Tetanus-Toxoid-Verabreichung über das Trinkwasser waren unerwartet. Als Ursache für das Fehlen einer jeglichen immunogenen Wirkung der Vakzine vermuteten wir zunächst eine Impfstoffinaktivierung im Trinkwasser. Die einmalige subkutane Verimpfung von 0,2 ml Trinkwasser, in dem 2 Lf Tetanus-Toxoid seit vier Tagen bei 22 Grad Celsius gelöst vorlagen, schützte 90 % der geimpften Tiere. Man kann also annehmen, daß eine Inaktivierung des Toxoids als Ursache für dessen fehlende Wirksamkeit nicht in Frage kommt. Auch der Ersatz der Tränke durch konzentriertes Toxoid erbrachte keine Immunität, obwohl in diesem Falle pro Tier 3000 Lf Tetanus-Toxoid zur Verfügung standen. Wir nehmen an, daß die Aufnahme minimaler Toxoidmengen und das sofortige Abschlucken, welches wir bei der Beobachtung des Trinkvorganges der Mäuse feststellen konnten, für die Unwirksamkeit der Trinkwasserimmunisierung verantwortlich ist. Zur Klärung dieser Frage sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit denen aus der Literatur zu Beginn dieses Jahrhunderts ist nur unter Vorbe-

halt möglich. Toxin, Anatoxin und Antitoxin waren zu dieser Zeit in keiner Weise standardisiert oder definiert, so daß nachträglich nicht mehr mit Exaktheit nachvollzogen werden kann, in welcher Höhe sich die angegebenen Toxin- und Antitoxingaben oder die Serumantitoxintiter tatsächlich bewegten. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, daß Toxin und Anatoxin wesentlich schwächer waren als es die heutzutage hergestellten sind.

Bei keinem der oral geimpften Tiere wurden Unverträglichkeitsreaktionen beobachtet. Selbst nach Anwendung der extrem hohen Toxoid-Konzentration von 400 Lf in 0,5ml traten keine Störungen im Allgemeinbefinden der Tiere auf. Die Unschädlichkeit des oral verabreichten Tetanus-Toxoids bei Mäusen kann somit angenommen werden.

Die erfolgreiche orale Immunisierung ließ sich auch serologisch durch den Nachweis von spezifischen Antitoxinen belegen. Bei den geimpften Tieren zeigte sich eine enge Korrelation zwischen dem Wirksamkeitsindex und der Höhe des Antitoxintiters. Nach einer einmaligen Impfstoffapplikation über Sonde A mit einer gegenüber der subkutanen Impfung 100-fach höheren Dosis Tetanus-Toxoid entwickelten sich gleiche Antitoxinwerte im Serum, wie nach einer einmaligen subkutanen Impfung. Dieses Ergebnis ist überraschend, wenn wir bedenken, daß die über Sonde A geimpften Mäuse einen um 35 niedriger liegenden Wirksamkeitsindex aufzuweisen hatten als die parenteral geimpften.

Durch eine zweimalige subkutane Impfung stiegen bei der Maus die Antitoxinwerte auf weit über 5 I.E. pro ml, sowohl vor als auch nach der Belastung. Dieser Wert liegt deutlich über dem Antitoxintiter von Mäusen nach einer dreimaligen oralen Impfung im Abstand von drei Tagen, obwohl beide Gruppen im Belastungsversuch den gleichen Schutz aufwiesen. Wir dürfen annehmen, daß die zweimal subkutan geimpften Mäuse eine weitaus höhere Belastungsdosis überleben würden, als die auf oralem Weg geimpften.

Abschließend stellt sich die Frage, ob die Maus als Versuchstier für die Untersuchungen über eine orale Tetanusimmunisierung geeignet ist. Die Maus gehört in die Gruppe der gegenüber einer natürlichen Tetanusinfektion nahezu unempfindlichen Lebewesen. Aus diesem Grunde liegt die Vermutung nahe, daß durch eine orale Tetanusimmunisierung bei einem anderen Versuchstier möglicherweise bessere Ergebnisse zu erzielen gewesen wären. Dies wird durch die Arbeit von BARR et al. (5) bestätigt, die Mäuse gegen eine Immunisierung mit Tetanus-Toxoid "weit widerspenstiger" fanden als Meerschweinchen. Auch DIETRICH (15) erreichte bei Mäusen vom unbehandelten Darm her keine Resorption des Tetanus-Toxoids. BARTLEMA et al. (3) stellten fest, daß die sonst so erfolgreiche Toxoidapplikation in Form von Aerosol bei Mäusen keine Immunantwort auslöste, wenn dem Aerosolimpfstoff nicht ein passendes Adjuvans zugefügt wurde.

Ausschlaggebend für unsere Entscheidung, die Maus dennoch als Versuchstier zu wählen, waren ihre Vorteile in arbeitstechnischer Hinsicht. Da sie ein sehr kleines Versuchstier ist, war uns die Möglichkeit gegeben, unsere Versuche jeweils auf eine relativ große Zahl von Tieren auszudehnen. Das Ziel unserer Untersuchungen war, neue Grundlagen für eine orale Immunisierung des Menschen mit Tetanus-Toxoid zu erarbeiten und lag nicht in der Entwicklung einer optimalen oralen Impfmethode für die Maus.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

In Modellversuchen an der Maus wurde die Möglichkeit einer oralen Immunisierung mit Tetanus-Toxoid untersucht. Die Wirksamkeit der oralen Toxoidverabreichung wurde im Belastungsversuch und mit der Antitoxinbestimmung geprüft.

Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Eine orale Immunisierung von Mäusen gegen eine Tetanusinfektion ist grundsätzlich möglich. Nach einer einmaligen Impfung mit 200 Lf Tetanus-Toxoid mittels Sonde in den Oesophagus wurde ein Wirksamkeitsindex von 55 erreicht, nach einmaliger Applikation der gleichen Impfstoffmenge in die Mundhöhle ein solcher von 75. Eine selbständige Aufnahme der gleichen Toxoidmenge über das Trinkwasser oder Zuckerwürfel führte zu keiner Immunitätsbildung. Ein 100 %iger Schutz im Belastungsversuch trat nach einer dreimaligen Impfung (jeweils 200 Lf Tetanus-Toxoid) mit der Sonde im Abstand von drei Tagen ein. Im Vergleich dazu erzielten wir bei der einmaligen subkutanen Applikation von 2 Lf Tetanus-Toxoid einen Wirksamkeitsindex von 90. Nach einer zweimal im Abstand von 15 Tagen erfolgten subkutanen Verabreichung von 2 Lf Toxoid waren alle geimpften Tiere gegen eine Tetanusinfektion geschützt.

2. Je intensiver das Toxoid mit den Schleimhäuten des oberen Verdauungs- und Respirationstraktes in Kontakt kam, um so besser war der erzielte Impfschutz.
3. Die durch die Testinfektion erhaltenen Schutzwerte korrelieren eng mit dem Gehalt an Antitoxinen im Serum.

SUMMARY

In experiments with mice the suitability of oral immunisation with tetanus toxoid was investigated. The efficacy of oral toxoid treatment was tested in challenge and the antitoxine content was determined.

The results of the experiments may be summarised as follows:

1. Oral immunisation of mice against tetanus infection is generally possible. Through a single injection with 200 Lf tetanus toxoid administered with a sound into the oesophagus an efficiency rate of 55 was obtained. One single application of the same amount of vaccine into the mouth with water or pieces of sugar did not result in immunisation. A 100 % protection was obtained in challenge after three injection charges administered with three day intervals (with 200 Lf tetanus toxoid each) with the sound, compared with an efficiency rate 90 with one single subcutaneous application of 2 Lf tetanus toxoid. After two subcutaneous applications of 2 Lf toxoid within 15 days all the vaccinated animals were protected against tetanus infection.
2. Protection against tetanus infection increased the more the toxoid was given the chance of coming into contact with the mucosal epithelium of the upper digestion and respiration tracts.
3. The efficiency rates obtained in challenge correlate to a high degree with antitoxine content in the serum.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Alatyrtseva, I.E. Single intranasal revaccination with
and A. Mayansky diphtheria-tetanus toxoid
J. Mikrobiol. 5, 81 (1967)
zit. nach Breuel, H.P. (10)
2. Alexandrov, N.I., A comparative study of reactogenicity
N.E. Gefen, and immunological efficiency in aerosol
N.B. Egorova, and subcutaneous methods of typhoid
I.V. Vorontsov, and tetanus revaccination
L.S. Kreinin, Zh. Mikrobiol. 4, 15 (1967)
I. Miroshnichenko zit. nach Breuel, H.P. (10)
et al.
3. Bartlema, H.C., Studies on respiratory immunization
R. Braunius and with tetanus toxoid: the role of
L. Hölscher adjuvants
Medical Biological Laboratory TNO,
139 Lange Kleiweg, Rijswijk 2100,
The Netherlands (1970)
4. Behring, E.v. Über Immunisierung und Heilung von
und K. Wernicke Versuchstieren bei der Diphtherie
Z.f. Hyg. 12, 10 (1892)
5. Barr, M., The immunity responses of mice to
A. Fulthorpe and injections of diphtheria and tetanus
M. Llewellyn-Jones prophylactics
Br. J. exp. Path. 38, 312 (1957b)
6. Bischoff, H. Zur Frage der peroralen Diphtherie-
immunisierung
Ms. Kinderheilk. 39, 305 (1928)

7. Bousfield,G. Restoration of diphtheria immunity
without injections,toxoid pastilles
by mouth
zit.nach Greenberg,L.,M.Detlor and
J.Gibbard (26)

8. Breton,M. et Passage de la toxine et de l'antitoxine
L.Petit tétaniques à travers la muqueuse du
gros intestin
C.R.Soc.Biol. 64, 160 (1908)

9. Breton,M. et Vaccination contre la diphtérie par
L.Petit la voie gastrique et par voie rectale
C.R.Soc.Biol. 64, 813 (1908)

10. Breuel,H.P. Lokale Immunisierung mit nicht vermeh-
rungsfähigen Mikroorganismen oder
ihren Antigenen
Literaturdokumentation,Reihe H F
Gustav Fischer Verlag,Stuttgart (1969)

11. Carrière,G. Etude expérimentale sur le sort des
toxines et des antitoxines introduites
dans le tube digestif des animaux
Ann.Inst.Pasteur 13, 435 (1899)

12. Charrin,M. zit.nach Carrière,G. (11)

13. Charrin,M. et Action des sucs digestifs sur les
G.Levèvre toxines
C.R.Soc.Biol. 50, 878 (1898)

14. Cockburn,W.C., Reinforcing doses of diphtheria toxoid
C.M.Bradstreet, absorbed through the buccal mucosa
M.E.Bailey and Br.Med.J. 1961, 1754
J.Ungar

- | | |
|---|---|
| 15. Dietrich,W. | Resorption von Tetanusgift durch den Darm
Klin.Ws. 1922, 1160 |
| 16. Dold,H. und
W.Weyrauch | Ein Beitrag zu den Versuchen einer peroralen Immunisierung gegen Diphtherie
Z.Immun.F. <u>51</u> , 458 (1927) |
| 17. Dumas,J.,
D.Combiesco et
J.Balteano | Action des toxines tétanique et diph-
térique per os
C.R.Ac.Sci. <u>175</u> , 793 (1922) |
| 18. Dzierzowsky,L. | Über die aktive Immunisierung des Menschen gegen Diphtherie
Z.Immun.F.2.Abt. <u>3</u> , 602 (1910) |
| 19. Fuerst,K. | Zur Frage der oralen Diphtherieimmu-
nisierung
Klin.Ws. 1926, 2021
Zbl.ges.Hyg. <u>14</u> , 440 (1927) |
| 20. Fuerst,K. und
M.Klotz | Über perorale Immunisierung.Bemerkun-
gen zu der Arbeit von Pockels in
Jg.6, Nr.45, Seite 2137 dieser Wochen-
schrift
Klin.Ws. 1928, 118
Zbl.ges.Hyg. <u>17</u> , 408 (1928) |
| 21. Gabritschewski,L. | Sitzung vom 4.Dezember 1904 der Sek-
tion für Bakteriologie der Kaiserli-
chen Gesellschaft für Naturkunde,
Ethnologie und Anthropologie in Moskau
Zbl.Bakt.I.Ref. <u>36</u> , 466 (1905) |
| 22. Gebb,H. | Aktive Immunisierung vom Konjunktivi- |

valsack aus mittels Toxinen
Arch.Aug.Hlkd. 64, 310 (1909)
Zbl.Bakt.I.Ref. 46, 105 (1910)

23. Gefen, N.E. Immunization with aerosols prepared from dried live vaccines and toxoids. I. Theoretical and experimental prerequisites for the development of a method of aerosol vaccination
zit.nach Breuel, H.P. (10)
24. Gibier, P. Des effets produits sur certains animaux par les toxines et les antitoxines de la diphtérie et du tétanos injectées dans le rectum
C.R.Ac.Sci. 122, 1075 (1896)
25. Gold, H. Active immunization against tetanus by the combined subcutaneous and intranasal routes
Am.J.Surg. 48, 359 (1940)
zit.nach Herrlich, A., Handbuch der Schutzimpfungen, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1965, 446
26. Greenberg, L., M. Detlor and J. Cibbard The oral use of diphtheria toxoid in immunization. Experiments with guinea pigs
Can.J.publ.Hlth. 41, 103 (1950)
27. Greenberg, L. and D.S. Fleming Experience with oral immunization against diphtheria and tetanus in human subjects
Can.J.publ.Hlth. 41, 445 (1950)

28. Hamada, H. Experimental studies on peroral immunization by diphtheria anatoxin or antisera (IV)
Acta dermat. 29, 66 (1937)
Zbl.ges.Hyg. 40, 382 (1938)
29. Hamada, H. Experimental studies on the peranal immunization by diphtheria anatoxin or antisera (V)
Acta dermat. 29, 123 (1937)
Zbl.ges.Hyg. 40, 673 (1938)
30. Ibrahim, H. Versuche über den Immunisierungseffekt auf verschiedene Weise applizierter Antigene
Z.Immun.F. 62, 219 (1929)
31. Jansen, B.C.,
P.C.Knoetze and
F.Visser The antigenicity of Clostridium botulinum type C toxin administered per os
Ondersteepoort J.Vet.Res. 37, Nr.3,
169 (1970)
32. Katitch, R.V. Examen de la possibilité d'immuniser activement des animaux d'expérience par voie orale avec la toxine de Clostridium botulinum (C)
Rev.Immun. 16, 309 (1952)
33. Klotz, M. Über perorale Diphtherieimmunisierung
Ms.Kinderheilk. 40, 444 (1928)
34. Kuhns, W.J. The relationship of immediate wheal reactions to the repeated administration of diphtheria and tetanus toxoid
J.Immun. 89, 652 (1962)

35. Lemétayer, E. Essais d'immunisation active du lapin
et du cobaye par administration
d'anatoxine tétanique par les voies
buccale et rectale
Presse méd. 1935, 761
Zbl.Bakt.I.Ref. 86, 119 (1935)
36. Löwenstein, E. Die innerliche Darreichung des Alt-
tuberkulins
Z.f.Tub. 9, 392 (1906)
37. Masucci, P., Restoration of diphtheria immunity
H.Gold and without injections
R.J.de Falco J.Ped. 32, 35 (1948)
zit.nach Greenberg, L. and D.S.Fle-
ming (27)
38. McClintock, C.T. The oral administration of antitoxins
and W.E.King for prevention of diphtheria, tetanus
and possibly sepsis, with some obser-
vations on the influence of certain
drugs in preventing digestion and
promoting absorption from the ali-
mentary canal
J.Infect.Dis. 3, 701 (1906)
39. McQuarrie, M.J. zit.nach Greenberg, L. and D.S. Fle-
and P.Moloney ming (27)
40. Nathan-Larrier, L., L'anatoxine tétanique et l'immunité
G.Ramon et antitétanique chez la mère et le
E.Grasset nouveau né
Ann.Inst.Pasteur 41, 848 (1927)
41. Nencki, M., Die Entgiftung der Toxine durch die

- N.Siebern und
E.Schoumow-
Simanowski
- Verdauungssäfte
Zbl.Bakt.I.Orig. 23, 840 und 880 (1898)
42. N.N. Report by the publ.Hlth.Labor.Serv.
and the Manchester Education Committee
School of Health Service.A trial of
reinforcing doses of diphtheria toxoid
absorbed through the buccal mucosa
J.Hyg. 61, 425 (1963)
43. Petrini,M. zit.nach Greenberg,L. and D.S.Fleming
(27)
44. Pockels,W. Diphtherieimmunisierung per os
Klin.Ws. 1925, 1454
45. Pockels,W. Ist eine perorale Immunisierung gegen
Diphtherie mit abgetöteten Diphtherie-
bazillen möglich
Klin.Ws. 1927, 2137
46. Raettig,H.J. Die orale Impfung mit inaktivierten
Mikroorganismen
Bundesgesundheitsblatt, 14.Jg., Nr.11,
141,(1971)
47. Ramon,G. et
E.Grasset Sur l'immunité antitoxique active
par voie buccale chez l'animal d'ex-
périence
C.R.Soc.Biol. 95, Nr.36, 1405 (1926)
48. Ramon,G. et
E.Grasset Recherches sur le passage des toxines,
des anatoxines et des antitoxines à
travers les parois du tube digestif.

De l'immunité antitoxique active et passive par voie digestive chez l'animal d'expérience
Ann.Inst.Pasteur 41, 868 (1927)

49. Ramon,G. et C.Zoeller
Essais d'immunisation antitoxique, active et passive, par voie buccale chez l'homme
C.R.Soc.Biol. 95, Nr.36, 1409 (1926)
50. Ramon,G. et C.Zoeller
Nouveaux résultats concernant les rhinovaccinations antitoxiques
Presse méd. 1927, 949
Zbl.Bakt.I.Ref. 88, 490 (1928)
51. Ramon,G. et C.Zoeller
De l'immunisation antitoxique par voie nasale chez l'homme et du mécanisme de l'immunisation occulte
C.R.Soc.Biol. 96, 757 (1927)
52. Ransom,F.
Das Schicksal des Tetanusgiftes nach seiner intestinalen Einverleibung in den Meerschweinchenorganismus
D.med.Ws. 1898, 117
53. Regamey,R.
Etude in vivo et in vitro sur le sort de la toxine tétanique dans le tube digestif
Ann.Inst.Pasteur 56, 87 (1936)
54. Reiter,H. und M.Soldin
Versuche einer prophylaktischen Immunisierung gegen Diphtherie auf peroralem Wege
D.med.Ws. 52, 1337 (1926)

55. Said Bilal Quelques notes sur l'emploi des anatoxines en Turquie
Rev.Immun. 12, 261 (1948)
zit.nach Herrlich,A.,Handbuch der Schutzimpfungen, Springer Verlag, Berlin,Heidelberg,New York 1965, 446
56. Saito,S. Studien über die Diphtherieimmunisierung mittels Inhalation.IV.Mitteilung. Vergleichende Studien über die aktive Immunisierung durch Inhalation und durch Subkutaninjektion
Acta dermat. 30, 66 (1937)
Zbl.ges.Hyg. 41, 528 (1938)
57. Saito,S. Studien über die Diphtherieimmunisierung mittels Inhalation.V.Mitteilung. Über die Wiederinhalation und Wiederinjektion des Antigens nach Rückgang des von der aktiven Immunisierung herührenden Antitoxintiters im Blut
Acta dermat. 30, 69 (1937)
Zbl.ges.Hyg. 41, 528 (1938)
58. Saito,S. Studien über die Diphtherieimmunisierung mittels Inhalation.VI.Mitteilung. Über die dritte Immunisierung durch Inhalation des Antigens
Acta dermat. 30, 72 (1937)
Zbl.ges.Hyg. 41, 529 (1938)
59. Silberschmidt,W. Essais d'immunisation par inhalation. I.Diphtérie et tétanos
Ann.Inst.Pasteur 52, 690 (1934)

60. Silberschmidt,W. Essais d'immunisation par inhalation contre la diphtérie et le tétanos
Bull.Acad.nat.Méd. 111, 653 (1934)
Zbl.ges.Hyg. 32, 217 (1934)
61. Silberschmidt,W. Über Inhalationsversuche mit Toxinen (Diphtherietoxin,Tetanustoxin,Ricin)
Festschrift Zangger 2, 618 (1935)
Zbl.ges.Hyg. 34, 107 (1935)
62. Sternberg,C. Über die Erzeugung von Antikörpern durch rektale Einverleibung der Antigene und über die Resorption rektal eingebrachter Antikörper
Wien.klin.Ws. 1908, 709
Zbl.Bakt.I.Ref. 42, 422 (1908)
63. Titarenko,I.F. Experimentelle Beobachtungen bei Gruppenimpfungen mit Toxoid-Aerosolen (Tetanus und Staphylokokken)
Zh.Mikrobiol. 2, 8 (1962)
Zbl.Bakt.I.Ref. 191, 181 (1963)
64. Veronesi,R.,
A.Corrêa and
J.Tavares
A new outlook on the prophylaxis of tetanus:immunization by the digestive route
Rev.Hosp.Clin.Fac.Med.Sao Paulo 27,
123 (1972)
65. Vincent,H. Action de la bile sur la toxine tétanique
C.R.Soc.Biol. 63, 623 (1907)
66. Vincent,H. Deuxième note sur les propriétés anti-

- 'toxiques de la bile.Action des éléments composants de la bile sur la toxine tétanique
C.R.Soc.Biol. 63, 695 (1907)
67. Vincent,H. Action du gros intestin sur la toxine tétanique
C.R.Soc.Biol. 64, 162 (1908)
68. Vincent,H. Sur le mode de destruction de la toxine tétanique dans l'estomac
C.R.Soc.Biol. 64, 729 (1908)
69. Vincent,H. Mode de destruction de la toxine tétanique dans l'intestin;action antitoxique du suc pancréatique activé
C.R.Soc.Biol. 64, 797 (1908)
70. Wehrmann,M. zit.nach Carrière,G. (11)
71. Weinberg,M. et Vaccination anti-botulinique par voie
P.Goy souscutanée et per os
C.R.Soc.Biol. 93, 430 (1925)
72. Welikanow,I.M. Experimentelle Vaccination gegen den Botulismus
Z.Immun.F. 70, 186 (1931)
73. Welikanow,S. und Experimentelle Immunisierung per os
M.Kolesnikowa gegen Botulismus
J.Epidemiol.i.Mikrobiol. Nr.3 (1934)
Zbl.Bakt.I.Ref. 118, 174 (1935)
74. Wishart,F.O. and Recall dose of tetanus toxoid by the

- L.K.Jackson intranasal or intraocular route
Can.J.publ.Hlth. 41, 43 (1950)
zit.nach Herrlich,A.,Handbuch der
Schutzimpfungen, Springer Verlag,
Berlin,Heidelberg,New York 1965, 446
75. Yamashiroya,H.M. Aerosol vaccination with tetanus
et al. toxoid
Bact.Rev. 30, 624 (1966)
76. Yamashiroya,H.M., Aerosol immunization of guinea pigs
R.Ehrlich and with fluid tetanus toxoid
J.M.Magis J.Bact. 91, 903 (1966)
77. Yourevitch,V. Essai d'immunisation des lapins par
voie buccale avec l'anatoxine diphtérique
C.R.Soc.Biol. 119, 516 (1935)

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und für wertvolle Hinweise danken.

Besonders herzlich danke ich Herrn Dr. G. Baljer für die jederzeit gewährte hilfreiche Unterstützung.

LEBENS LAUF

Am 15. November 1947 wurde ich als Tochter des Chemikers Dr. Georg Gros und seiner Ehefrau Friedel, geb. Jockerst, in Bad Peterstal geboren.

Nach vier Volksschuljahren in Oppenau bei Offenburg trat ich in das Gymnasium ein und bestand im Herbst 1966 am Okengymnasium in Offenburg die Reifeprüfung.

Nach dem Abitur studierte ich zwei Semester Französisch an der Universität von Besançon und verließ diese mit dem Diplôme de Langue Française.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich an der tierärztlichen Fakultät der Universität München mit dem Studium der Veterinärmedizin. Dieses schloß ich im Frühjahr 1973 mit dem Staatsexamen ab.

Am 16. Mai 1969 verheiratete ich mich mit dem Tierarzt Dr. Franz Starflinger.

